

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

2013

### **Expressão de genes mitocondriais no músculo de codornas de alta e baixa eficiência alimentar submetidas a diferentes temperaturas ambientais<sup>1</sup>**

Eliane Gasparino<sup>2</sup>, Débora Marques Voltolini<sup>3</sup>, Ana Paula Del Vesco<sup>3</sup>, Carlos Souza do Nascimento<sup>4</sup>, Simone Eliza Facioni Guimarães<sup>4</sup>, Odair Scatolin Rossafa Garcia<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – UEM, Maringá. e-mail: [egasparino@uem.br](mailto:egasparino@uem.br)

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM, Maringá. e-mail: [deborasommer@yahoo.com.br](mailto:deborasommer@yahoo.com.br); [apaulavesco@gmail.com](mailto:apaulavesco@gmail.com)

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa.

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFRRJ, Seropédica.

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de mRNA ANT e COX III no músculo de codornas de alta e baixa eficiência alimentar submetidas a três diferentes temperaturas: conforto, estresse por calor (38°C) por 12 horas e estresse por frio (10°C) por 12 horas. Maior expressão de mRNA ANT foi observada em aves de alta EA e em aves expostas ao estresse por frio. Maior expressão de mRNA COX III foi observada em aves de alta EA e que foram submetidas ao estresse por frio, e a menor expressão observada em aves de baixa EA expostas ao estresse por calor. Os resultados desse estudo sugerem uma possível relação entre genes envolvidos na produção de energia pelas mitocôndrias e o fenótipo de eficiência alimentar, e que a temperatura ambiental afeta a expressão de mRNA ANT e COX III. Codornas apresentando diferentes níveis de eficiência alimentar podem responder aos estímulos do ambiente de forma diferente.

**Palavras-chave:** ATP, eficiência alimentar, estresse por calor, estresse por frio, mitocôndria

### **Mitochondrial gene expression in the muscle of high and low feed efficiency Japanese quail layers submitted to different environmental temperatures**

**Abstract:** We had the objective of evaluating the ANT and COX III mRNA expression in the muscle of Japanese quails presenting high and low feed efficiency (FE) and submitted to three different environmental temperatures: comfort, heat stress (38°C) and cold stress (10°C). In the muscle greater ANT mRNA expression was observed for high FE and for cold stress animals. The greatest COX III mRNA expression in the muscle was observed for high FE animals and that were subjected to cold stress. The obtained results suggest a possible correlation between genes involved in energy production by mitochondria and feed efficiency phenotype, and that environmental temperature affect the ANT and COX III mRNA expression. Japanese quails presenting different feed efficiency levels respond differently to environmental stimuli.

**Keywords:** ATP, cold stress, feed efficiency, heat stress, mitochondria

### **Introdução**

Estudos recentes têm mostrado que animais mais eficientes em converter alimentos em peso corporal podem apresentar alterações na expressão de genes da cadeia transportadora de elétrons, o que pode influenciar a utilização de nutrientes e alterar o gasto energético corporal. Estas pesquisas sugerem que animais com maior consumo de ração residual, possuem falha no transporte de elétrons/prótons, reduzindo a eficiência de produção de ATP pelas mitocôndrias, o que influencia negativamente a eficiência alimentar (BOTTJE & CARSTENS, 2009). Este trabalho foi realizado sob a hipótese de que genes envolvidos na produção de energia pelas mitocôndrias podem estar relacionados ao fenótipo de eficiência alimentar em aves, e que o ambiente a qual estes animais são expostos podem afetar a expressão de tais genes. Assim, nós tivemos o objetivo de avaliar a expressão de mRNA dos genes mitocondriais da adenina nucleotídeo translocase (ANT) e do citocromo c oxidase subunidade III (COX III) no músculo de codornas de postura de alta e baixa eficiência alimentar (EA) e submetidas a três diferentes temperaturas: conforto, estresse por calor (38°C) por 12 horas e estresse por frio (10°C) por 12 horas.

### **Material e Métodos**

Inicialmente 300 codornas de postura, foram criadas convencionalmente até os 28 dias de idade sob as mesmas condições experimentais. Nessa idade as aves foram transferidas para gaiolas individuais, e passaram por um período de adaptação de sete dias. A avaliação da eficiência alimentar (EA) ocorreu no intervalo de 35 a 42 dias de vida, e foi calculada pelo aumento do peso corporal em relação ao consumo de alimento. Para isso foi medido o consumo de ração e ganho de peso individuais nesse período. Após o período de avaliação da eficiência alimentar, os animais foram divididos em três ambientes: conforto, estresse por calor (38°C) por 12



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

horas e estresse por frio (10°C) por 12 horas. Após o período de estresse térmico proposto, dez aves de cada tratamento foram eutanaseadas por deslocamento cervical e o músculo foi coletado e armazenado em RNA Holder® (BioAgency Biotecnologia, Brasil) à - 20°C até o momento da extração de RNA. Apenas seis animais de cada tratamento foram utilizados para a análise de expressão genica. O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Máster Mix (Applied Biosystems, USA). Os primers utilizados nas reações para a amplificação do ANT e COX III foram desenhados de acordo com OJANO-DIRAIN et al. (2007). O gene da  $\beta$ -actina (n° de acesso - L08165) foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25  $\mu$ L e em duplicatas.

Os resultados foram apresentados como médias e desvios padrões. O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para verificar a normalidade de todos os dados, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) (SAS, 2000).

### Resultados e Discussão

Após o período de avaliação da eficiência alimentar, as aves foram divididas em dois grupos homogêneos: um grupo de alta EA (0,23g/g) e outro de baixa EA (0,17g/g).

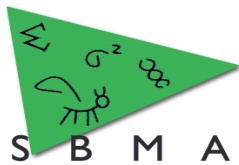
Pôde ser observado que a expressão de mRNA ANT sofreu efeito de eficiência alimentar: codornas de alta EA apresentaram maior expressão que aves de baixa EA; e também sofreu efeito de ambiente, em que maior expressão foi observada em animais expostos a estresse por frio, seguido por conforto, e então por animais expostos ao estresse por calor (Tabela 1).

Tabela 1- Expressão de mRNA ANT e COX III no músculo de codornas de postura de alta e baixa eficiência alimentar submetidas a três ambientes

		ANT	COX III
Alta EA	Conforto	6,57 $\pm$ 2,19	0,08 $\pm$ 0,03b
	Estresse por calor	5,29 $\pm$ 0,67	0,10 $\pm$ 0,02b
	Estresse por frio	8,80 $\pm$ 0,75	0,14 $\pm$ 0,03a
Baixa EA	Conforto	8,37 $\pm$ 0,53	0,08 $\pm$ 0,01b
	Estresse por calor	5,52 $\pm$ 0,58	0,06 $\pm$ 0,02c
	Estresse por frio	9,42 $\pm$ 0,71	0,08 $\pm$ 0,008b
Efeitos principais			
Eficiência	Alta	7,77 $\pm$ 1,79a	0,11 $\pm$ 0,04
	Baixa	6,87 $\pm$ 1,98b	0,07 $\pm$ 0,02
Ambiente			
	Conforto	7,47 $\pm$ 1,78b	0,08 $\pm$ 0,02
	Estresse por calor	5,40 $\pm$ 0,61c	0,08 $\pm$ 0,03
	Estresse por frio	9,11 $\pm$ 0,77a	0,11 $\pm$ 0,03
Probabilidades			
Eficiência		0,0196	<,0001
Ambiente		<,0001	0,0006
Interação		0,1974	0,0040

Valores são médias com seus desvios padrões.

<sup>a,b,c</sup> Letras idênticas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Observou-se efeito de interação entre EA e ambiente sobre a expressão do COX III, tendo sido a maior expressão encontrada em aves de alta EA e que foram submetidas ao estresse por frio, e a menor expressão observada em aves de baixa EA expostas ao estresse por calor (Tabela 1).

Os resultados deste trabalho mostram que animais de maior EA também apresentaram maior expressão de genes mitocondriais conhecidos por estarem relacionados a maior eficiência da produção de energia. Muitos estudos na literatura mostram que pode haver relação entre a expressão de genes mitocondriais com a eficiência alimentar (OJANO-DIRAIN et al., 2007; IQBAL et al., 2005). Assim, como em nosso trabalho, esses autores verificaram maior expressão de mRNA ANT e COX III em aves de maior eficiência alimentar.

A novidade deste trabalho é o fato de que aves de alta e baixa EA foram submetidas ao estresse por frio e calor. Este objetivo é devido ao fato de que na literatura há muitos trabalhos que mostram o efeito da temperatura sobre o metabolismo da aves e até mesmo sobre o fenótipo de eficiência alimentar (HANGALAPURA et al., 2004); estes estudos mostram que mudanças na temperatura ambiental acima ou abaixo da zona de conforto térmico estimulam mecanismos fisiológicos que podem afetar o desempenho animal, entre estes está o fato de que a temperatura ambiental é uma determinante importante da cadeia respiratória em diferentes tecidos, tendo sido observada maior atividade da cadeia em animais submetidos a baixas temperaturas (MARTIN et al., 1993).

### Conclusões

Os resultados desse estudo sugerem uma possível relação entre genes envolvido na produção de energia pelas mitocôndrias e o fenótipo de eficiência alimentar, e que a temperatura ambiental afeta a expressão de mRNA ANT e COX III. Codornas apresentando diferentes níveis de eficiência alimentar podem responder aos estímulos do ambiente de forma diferente.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a CAPES pelos auxilio financeiro.

### Literatura citada

- BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**, v.87, p.E48-E63, 2009.
- HANGALAPURA, B.N.; NIEUWLAND, M.G.B.; BUYSE, J. et al. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. **Poultry Science**, v.83, p.1644-1649, 2004.
- IQBAL, M.; PUMFORD, N.R.; TANG, Z.X. et al. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. **Poultry Science**, v.84, p.933-941, 2005.
- MARTIN, I.; VINAS, O.; MAMPEL, T. et al. Effects of cold environment on mitochondrial genome expression in the rat: evidence for a tissue-specific increase in the liver, independent of changes in mitochondrial gene abundance. **Biochemical Journal**, v.296, p.231-234, 1993.
- OJANO-DIRAIN, C.; TOYOMIZU, M.; WING, T. et al. Gene expression in breast muscle and duodenum from low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v.86, p.372-381, 2007.